



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



Numéro de publication: **0 643 922 A1**

12

## DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

21 Numéro de dépôt: **94111929.9**

51 Int. Cl.<sup>6</sup>: **A23L 1/227**

22 Date de dépôt: **30.07.94**

30 Priorité: **21.09.93 CH 2836/93**

43 Date de publication de la demande:  
**22.03.95 Bulletin 95/12**

84 Etats contractants désignés:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL  
PT SE**

71 Demandeur: **SOCIETE DES PRODUITS NESTLE  
S.A.  
Case postale 353  
CH-1800 Vevey (CH)**

72 Inventeur: **Heyland, Sven  
Dorfstrasse 18  
CH-8534 Weiningen (CH)  
Inventeur: Ho Dac, Thang  
Ch. des Epinoux 8  
CH-1052 Le Mont-s/Lausanne (CH)  
Inventeur: Hose, Hugh  
Champ Murat 4  
CH-1436 Treykovagnes (CH)  
Inventeur: Wood, Robert Dustan  
Av. d'Echallens 63  
CH-1004 Lausanne (CH)**

74 Mandataire: **Wavre, Claude-Alain et al  
55, avenue Nestlé  
CH-1800 Vevey (CH)**

54 Agent aromatisant.

57 Procédé de préparation d'un agent aromatisant, dans lequel on fait fermenter des graines de légumineuses cuites avec une souche de *Bacillus subtilis* ou *Bacillus natto*, on prépare un mélange comprenant les graines fermentées, un sucre réducteur et de l'eau, on fait réagir le mélange par chauffage, et l'on sèche le produit de réaction.

EP 0 643 922 A1

La présente invention a pour objet un procédé de préparation d'un agent aromatisant dans lequel on fait réagir un mélange comprenant une source d'acides aminés libres et au moins un sucre réducteur.

Une manière traditionnelle de préparer une source d'acides aminés libres qui se prête à la confection d'un agent aromatisant par réaction avec un sucre réducteur, autrement dit par réaction de Maillard, est l'hydrolyse à l'acide chlorhydrique concentré d'une matière riche en protéines telle que des tourteaux d'arachide ou de soya, par exemple.

US 4466986 (Nestec S.A.) décrit un procédé de ce type, dans lequel on soumet l'hydrolysate à un fractionnement sur une colonne de charbon actif granulaire et, en sélectionnant ou en calibrant les fractions, on obtient une source d'acides aminés claire et neutre de goût qui ne masque pas l'arôme dégagé ensuite lors de la réaction de Maillard.

Cependant, dans des procédés plus récents, on préfère utiliser une hydrolyse plus douce que l'hydrolyse traditionnelle à l'acide chlorhydrique concentré, notamment une hydrolyse enzymatique. Un problème à résoudre avec de tels procédés réside dans l'amertume ou le goût particulier que peuvent présenter de tels hydrolysats.

US 5141757 (Nestec S.A.), par exemple, décrit un procédé de préparation d'un agent aromatisant dans lequel on hydrolyse avec une protéase une suspension aqueuse d'une matière riche en protéines telle qu'une farine de légumineuse, par exemple, et on fait mûrir ou on affine la suspension à l'aide d'enzymes de koji.

La présente invention a pour but de proposer un nouveau procédé de préparation d'un agent aromatisant dans lequel on fait réagir un mélange comprenant une source d'acides aminés libres obtenue par fermentation d'une matière riche en protéine, procédé qui permette d'obtenir un produit de réaction présentant un goût et une odeur agréables, notamment un goût dépourvu de toute amertume et, de préférence, une odeur relativement neutre.

A cet effet, dans le procédé selon la présente invention,

- on fait fermenter une matière riche en protéines avec une souche de *Bacillus subtilis* ou *Bacillus natto*,
- on prépare un mélange comprenant ladite matière fermentée, au moins un sucre réducteur et de l'eau,
- on fait réagir ledit mélange par chauffage, et
- l'on sèche le produit de réaction.

Pour mettre en oeuvre le présent procédé, on peut choisir ladite matière riche en protéines dans un groupe formé par des graines d'oléagineuses ou de légumineuses, le gluten de céréales, les protéines lactiques et des isolats ou concentrats de protéines végétales ou animales, par exemple.

Dans une forme de réalisation préférée du présent procédé, ladite matière riche en protéines se compose de graines de légumineuses cuites, notamment de graines de soya ou de caroube, dépelliculées ou non et/ou subdivisées, en particulier concassées, ou non. Pour préparer lesdites graines de légumineuses cuites, on peut les bouillir durant 40-60 min ou les faire tremper durant 20 min à 5 h à 20-60 °C et les chauffer ensuite à la vapeur, de préférence en autoclave ou dans un cuiseur à bande, à 120-140 °C durant 2-30 min ce qui assure non seulement la cuisson mais aussi la stérilisation des graines, par exemple.

Ladite souche de *Bacillus subtilis* ou de *Bacillus natto* peut être une souche du commerce telle qu'on peut s'en procurer notamment au Japon, ou une souche isolée d'un produit du commerce ou de l'artisanat local, à savoir un dawadawa ou un iru d'Afrique subsaharienne ou de l'ouest, ou un natto du Japon, de Chine, de Taiwan ou de Thaïlande, par exemple. On peut également se procurer de telles souches dans des collections officielles telles que l'American Type Culture Collection (ATCC) aux USA ou la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) en Europe.

De préférence, on sélectionne des souches de *B. natto* ou *B. subtilis* qui produisent relativement peu de mucilage visqueux tout en assurant une bonne hydrolyse et une teneur élevée de l'hydrolysate en acide glutamique. Ceci permet en particulier de faciliter des opérations de pompage et transfert du produit en cours de fabrication industrielle.

Pour préparer une culture ou levain desdites souches, on peut les cultiver dans un milieu aqueux contenant 1-5% de farine de soya, 0,5-3% d'extrait de malt et 0,0-0,6% d'extrait de levure, sous aération de 0,01-0,5 vol/vol/min, durant 10 h à 3 d à 30-45 °C, par exemple.

Pour faire fermenter ladite matière riche en protéines, de préférence sous forme humide et subdivisée, on peut l'inoculer avec 0,5-2,0 % en volume d'une culture contenant  $5 \times 10^7$  -  $10^9$  germes de ladite souche par ml, et laisser fermenter durant 1-7 d à 35-45 °C tout en aérant avec de l'air humide, notamment de l'air humidifié à saturation.

La matière riche en protéines fermentée peut présenter une odeur caractéristique du natto ou du dawadawa. Sans vouloir se lier par cette interprétation, on peut associer cette odeur caractéristique à la

présence dans la matière fermentée d'acides gras tels que l'acide 2-méthyl butanoïque et l'acide 3-méthyl butanoïque, par exemple, qui peuvent provenir respectivement de la dégradation des acides aminés isoleucine et leucine.

Dans le cadre de la présente invention, on a en effet constaté une corrélation très nette entre l'intensité de l'odeur caractéristique du natto ou du dawadawa et la concentration totale en ces deux acides que peut présenter la matière riche en protéines fermentée. De manière surprenante, l'intensité de cette odeur caractéristique et la concentration en ces deux acides diminuent fortement (diminution de la concentration de environ 40-60% sur matière sèche de la matière fermentée, par exemple) lors de la mise en oeuvre des étapes ultérieures du procédé. Mais elles peuvent néanmoins demeurer notables (concentration totale de environ 1600-2100 ppm sur matière sèche de matière fermentée, par exemple) dans le produit final.

Pour obtenir une matière fermentée présentant une odeur relativement neutre, qui se distingue de manière surprenante de l'odeur caractéristique du natto ou du dawadawa et qui permette d'obtenir un produit de réaction présentant un goût agréable, notamment un goût de viande, qui ne soit pas accompagné d'une odeur trop prononcée de natto ou de dawadawa, on peut ajouter à la dite matière riche en protéines, avant fermentation, 0,5-5% en poids d'hydrate de carbone, notamment de glucose et/ou de saccharose, ou d'une source d'hydrate de carbone, notamment de farine de riz ou de malt d'orge, assimilable par ladite souche.

On a constaté que l'on peut en effet diminuer ainsi notablement la concentration en acide 2-méthyl butanoïque et 3-méthyl butanoïque de ladite matière fermentée et par conséquent diminuer d'autant plus fortement celle du produit final.

On peut réaliser la fermentation sur des claies, sur un plateau percé de trous ou dans un appareil du commerce tel que l'appareil connu au Japon sous le nom de machine à koji, par exemple.

Dans la forme de réalisation préférée du présent procédé où la matière riche en protéines se compose de graines de légumineuses cuites, notamment de graines de soya concassées, on peut, avant de préparer le mélange pour ladite réaction, mettre les graines fermentées en suspension aqueuse à 15-19% en poids de chlorure de sodium. Dans ces conditions, les graines fermentées peuvent se conserver sans risque que la fermentation se poursuive de manière incontrôlée et avec un risque réduit de contamination par d'autres microorganismes.

Pour ladite réaction, on prépare de préférence un mélange présentant une teneur en eau de 35-55% et comprenant, en % en poids de matière sèche, 24-97% de ladite matière fermentée, 2-40% de chlorure de sodium, 1-4% de sucre réducteur ajouté, 0-2% d'une substance contenant du soufre, 0-15% de glutamate monosodique, et 0-15% de saccharose.

Les quatre derniers ingrédients ci-dessus sont destinés à donner, le cas échéant, au présent agent aromatisant le pouvoir de conférer un goût rappelant celui de la viande, un arôme renforcé et/ou un arôme arrondi. Ladite substance contenant du soufre peut être choisie dans le groupe comprenant la cystéine, la cystine, la méthionine, la thiamine et leurs mélanges, par exemple.

L'addition d'une quantité notable de chlorure de sodium, telle que le mélange en présente une teneur de 30-40%, par exemple, est préférée parcequ'outre l'effet attendu sur l'équilibre organoleptique que peut conférer l'agent aromatisant, elle permet d'obtenir simultanément un effet surprenant facilitant le séchage du produit après la réaction.

On peut faire réagir le mélange par chauffage à 80-150 °C durant 1 min à 4 h, les durées relativement courtes correspondant aux températures relativement élevées et inversement, 100 °C durant 3h étant une combinaison de valeurs intermédiaires recommandables, par exemple.

De préférence, on fait réagir le mélange par chauffage à 120-150 °C durant 1 à 40 min, car de la sorte on peut obtenir simultanément un effet surprenant de stérilisation chimique et bactériologique du produit de réaction.

De préférence, on sèche ensuite le produit de réaction jusqu'à une teneur en eau résiduelle inférieure ou égale à 2%.

On peut réaliser la réaction et le séchage dans deux appareils distincts, notamment dans une autoclave ou dans un cuiseur à bande et dans un séchoir sous vide, puis casser et broyer dans un moulin à marteaux la masse compacte obtenue, par exemple. On peut aussi réaliser la réaction et le séchage par cuisson extrusion dans une extrudeuse à double vis, et découper ou broyer délicatement le boudin expansé obtenu, par exemple.

L'agent aromatisant ainsi obtenu par le présent procédé peut être utilisé tel quel pour conférer une saveur relevée, notamment un goût rappelant celui de la viande aux mets les plus variés, ou en combinaison avec d'autres ingrédients, pour la confection de sauces et potages, par exemple.

Les exemples ci-après sont présentés à titre d'illustration du procédé et du produit selon la présente invention. Les pourcentages y sont donnés en poids sauf indication contraire.

**Exemple 1**

Pour préparer une culture ou levain de *B.natto*, on prépare un milieu de culture comprenant 4% de farine de soya non dégraissée, 2% d'extrait de malt, 0,5% d'extrait de levure et 93,5% d'eau. On stérilise le milieu à 125 °C durant 15 min et on l'inocule avec 1% d'une préculture contenant, par ml,  $5 \times 10^8$  germes d'une souche de *B.natto* isolée d'un natto artisanal du Japon. On incube à 40 °C durant 24 h sous agitation et sous aération à raison de 0,2 vol d'air par vol de milieu et par min.

On concasse des graines de soya non dépelliculées dans un moulin à marteau jusqu'à une dimension moyenne de particules de 3,6 mm. On trempe les graines de soya concassées dans une fois leur volume d'eau à 60 °C durant 30 min. On les cuit et stérilise dans un cuiseur à bande à 130 °C durant 4 min et on les refroidit à 40 °C. On les inocule en pulvérisant dessus, à la sortie du cuiseur à bande, 1% en volume de la culture préparée comme indiqué ci-dessus qui contient  $5 \times 10^8$  germes de *B.natto* par ml. On répartit la masse de graines inoculée dans une machine à koji en une couche de 40 cm d'épaisseur. On laisse fermenter durant 3 d tout en aérant en faisant passer au travers de la masse de l'air à environ 40 °C humidifié à saturation.

La température des graines cuites monte d'environ 40 °C à environ 45 °C entre la 4ème et la 8ème h de fermentation. Pour que cette température n'augmente pas davantage, on augmente le débit d'air que l'on insuffle au travers de la masse et l'on maintient ce débit jusqu'à la fin des premières 24 h, après quoi la température revient à environ 41 °C et l'on rétablit le débit d'air initial. Au cours de la fermentation, la teneur en matière sèche des graines cuites augmente progressivement de environ 50% à environ 63,5%.

A l'issue de la fermentation, les graines cuites fermentées présentent des teneurs respectives de 4,3% en azote total, 1,0% en azote aminé (soit environ 6,25% d'acides aminés et /ou peptides dont 1,04% d'acide glutamique) et 1,04% en sucres réducteurs, qui sont relativement élevées et conviennent particulièrement bien dans le cadre de la mise en oeuvre du présent procédé.

On mélange 36,2% de ces graines fermentées avec 29,2% d'eau, 0,9% de xylose, 19,7% de chlorure de sodium, 0,9% de cystéine, 6,6% de glutamate monosodique et 6,5% de saccharose.

On obtient ainsi un mélange présentant une teneur en eau de 42,76% et comprenant, en % en poids de matière sèche, 39,8% de matière sèche de graines fermentées dont 0,65% de sucres réducteurs, 1,5% de xylose, 34,4% de chlorure de sodium, 1,5% de cystéine, 11,4% de glutamate monosodique et 11,4% de saccharose.

On fait réagir le mélange par chauffage en cuve à double manteau à 100 °C durant 3 h. On le sèche sous une pression réduite de 15 mbar à 95 °C jusqu'à une teneur en matière sèche de 1,5%. On le casse et on le réduit en poudre.

L'agent aromatisant obtenu présente une teneur en eau de 2% et une teneur totale en acides 2-méthyl butanoïque et 3-méthyl butanoïque de 1865 ppm sur poids de matière sèche de graines fermentées.

Pour déguster cet agent aromatisant, on en dissout 5 g additionnés de 5 g de chlorure de sodium dans 1 L d'eau bouillante. L'eau ainsi aromatisée présente un goût agréable, dépourvu de toute amertume, rappelant celui d'un bouillon de viande rehaussé d'une odeur caractéristique de natto.

**Exemple 2**

On procède de la manière décrite à l'exemple 1, à l'exception du fait que l'on fait réagir ledit mélange en autoclave à 120 °C durant 40 min.

On obtient un agent aromatisant capable de conférer les mêmes propriétés organoleptiques que l'agent obtenu à l'exemple 1 mais qui présente une conservabilité exceptionnelle due au fait que ces conditions de réaction permettent d'obtenir simultanément une stérilisation chimique et biologique du produit.

**Exemple 3**

On procède de la manière décrite à l'exemple 1, à l'exception du fait que l'on inocule le mélange avec une culture de *B.subtilis* isolée d'un dawadawa de l'artisanat local d'Afrique subsaharienne.

On obtient un agent aromatisant qui, dégusté dans les mêmes conditions que celui de l'exemple 1, présente un goût agréable, dépourvu de toute amertume, rappelant celui d'un bouillon de viande rehaussé d'un goût caractéristique de dawadawa.

**Exemple 4**

On procède de la manière décrite à l'exemple 1 jusqu'à l'obtention des graines cuites fermentées.

On mélange 44% de graines fermentées avec 40% d'eau et 16% de chlorure de sodium. Cette suspension peut être conservée durant une semaine à température ambiante sans présenter de modification bactériologique ou organoleptique notable.

On mélange 78,8% de cette suspension aqueuse avec 0,8% de xylose, 6,8% de chlorure de sodium, 0,8% de cystéine, 6,4% de glutamate monosodique et 6,4% de saccharose. On obtient ainsi un mélange présentant une teneur en eau de 44,33% et une composition de la matière sèche semblable à celle du mélange obtenu à l'exemple 1.

On fait réagir le mélange en autoclave à 120 °C durant 40 min, on le sèche et on le réduit en poudre.

On obtient un agent aromatisant qui, dégusté dans les mêmes conditions que celui de l'exemple 1, présente un goût agréable, dépourvu de toute amertume, rappelant celui d'un bouillon de viande rehaussé d'une odeur caractéristique de natto.

**Exemple 5**

On procède de la manière décrite à l'exemple 4, à l'exception du fait que l'on ajoute aux graines, avant fermentation, un faible pourcentage d'hydrate de carbone ou d'une source d'hydrate de carbone assimilable, en l'occurrence 1% de glucose, dans le but d'atténuer l'odeur caractéristique de natto présenté par le produit final.

Le tableau I ci-après présente et permet de comparer la teneur totale en acides 2 et 3- méthyl butanoïques et l'intensité de l'odeur de natto présentées en plus du goût de viande par les agents aromatisants obtenus selon le présent exemple 5 et selon l'exemple 4.

Tableau I

Ex No	Hydrate de C ajouté	Acides 2- et 3-méthyl butanoïques (ppm)	odeur de natto
4		1865	caractéristique
5	1% glucose	746	fortement atténuée

Les résultats présentés dans ce tableau démontrent qu'il est possible de préparer par le présent procédé un agent aromatisant capable de conférer un goût agréable, notamment un goût de viande, dépourvu de toute amertume et, si désiré, rehaussé dans une mesure ajustable par l'odeur de natto ou de dawadawa.

**Revendications**

1. Procédé de préparation d'un agent aromatisant, dans lequel

- on fait fermenter une matière riche en protéines avec une souche de *Bacillus subtilis* ou *Bacillus natto*,
- on prépare un mélange comprenant ladite matière fermentée, au moins un sucre réducteur et de l'eau,
- on fait réagir ledit mélange par chauffage, et
- l'on sèche le produit de réaction.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel ladite matière riche en protéines se compose de graines de légumineuses cuites.

3. Procédé selon la revendication 2, dans lequel lesdites graines de légumineuses sont des graines de soya ou de caroube, dépelliculées ou non et/ou subdivisées, notamment concassées ou non.

4. Procédé selon la revendication 1, dans lequel on inocule ladite matière riche en protéines avec 0,5-2,0 % en volume d'une culture contenant  $5 \times 10^7$ - $10^9$  germes de ladite souche par ml, et l'on laisse fermenter durant 1-7 d à 30-45 °C tout en aérant avec de l'air humide.

5. Procédé selon la revendication 2, dans lequel, avant fermentation, on ajoute aux graines 0,5-5% en poids d'hydrate de carbone, notamment de glucose et/ou de saccharose, ou d'une source d'hydrate de carbone, notamment de farine de riz ou de malt d'orge, assimilable par ladite souche.

5 6. Procédé selon la revendication 2, dans lequel, avant de préparer le mélange pour ladite réaction, on met les graines fermentées en suspension aqueuse à 15-19% en poids de chlorure de sodium.

10 7. Procédé selon la revendication 1, dans lequel on prépare un mélange présentant une teneur en eau de 35-55% et comprenant, en % en poids de matière sèche, 24-97% de ladite matière fermentée, 2-40% de chlorure de sodium, 1-4% de sucre réducteur ajouté, 0-2% d'une substance contenant du soufre, 0-15% de glutamate monosodique, et 0-15% de saccharose.

8. Procédé selon la revendication 1, dans lequel on fait réagir le mélange par chauffage à 80-150 °C, de préférence à 120-150 °C, durant 1 min à 4 h, de préférence durant 1-40 min.

15 9. Procédé selon la revendication 1, dans lequel on sèche ledit produit de réaction jusqu'à une teneur en eau résiduelle égale ou inférieure à 2%.

20 10. Agent aromatisant obtenu par l'une des revendications 1-9.

25

30

35

40

45

50

55



Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande  
EP 94 11 1929

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
X	FR-A-2 210 359 (L.GIVAUDAN) * page 1, ligne 29-31 * * page 3, ligne 13-16 * * page 3, ligne 20-23 * * page 3, ligne 29-33 * * page 4, ligne 2-5 * * page 5, ligne 29 *	1,6,10	A23L1/227
A	* page 6, ligne 16-18; revendications; exemples 5,6 *	7	
Y	EP-A-0 406 598 (NESTLE) * revendications; exemple *	1-4,8,10	
Y	EP-A-0 199 981 (TERUMO) * colonne 2, ligne 16-18; revendications 1-5; exemple 1 *	1-4,8,10	
A	EP-A-0 030 327 (NESTLE) * page 3, ligne 15-31 * * page 7, ligne 10-25; revendications 1,4,7,8 *	1-10	
D	& US-A-4 466 986 (...)		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
A	EP-A-0 429 760 (NESTLE) * colonne 2, ligne 44-54 * * colonne 3, ligne 10-13; revendications 1-5 *	1-4	A23L
D	& US-A-4 141 757 (...)		
A	EP-A-0 320 057 (UNILEVER) * revendications 1,2,5 *	1,7	
A	WO-A-86 03943 (L.GIVAUDAN) * revendications *	1-3,8,10	
		-/--	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 16 Novembre 1994	Examinateur Van Moer, A
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons * : membre de la même famille, document correspondant	

EPO FORM 1503 01.82 (POMC8)



Office européen  
des brevets

## RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande  
EP 94 11 1929

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée
A	R.GHERNA ET AL. 'Catalogue of bacreria, phages and rDNA vectors' 1985, AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION sixteenth edition pages 22, 24, 29 *page 22, n 6598, 21415 à 21418* *page 24: "Bacillus natto"* *page 29, n 15245* -----	1
		CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications		
Lien de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examineur
LA HAYE	16 Novembre 1994	Van Moer, A
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

EPO FORM 1503 03.92 (POM 082)